

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-033087

(43)Date of publication of application : 10.02.1998

(51)Int.Cl.

A01K 67/027
C12N 15/09

(21)Application number : 08-193655

(71)Applicant : TANAKA KOICHI
WADA KEIJI

(22)Date of filing : 23.07.1996

(72)Inventor : TANAKA KOICHI
WADA KEIJI

(54) NON-HUMAN ANIMAL HAVING FUNCTIONALLY DEFECTIVE GLUTAMATE TRANSPORTER GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain non-human animal which has the functional defects of glutamate transporter gene in the chromosome of its somatic cells or in its productive cells and is useful for study on the physiological functions of proteins, elucidation of morbid physiology and causes of neurodegenerative diseases.

SOLUTION: This non-human animal has a glutamate transporter gene, for example, GluT-1 gene and/or GIT1 gene, having deficiency in some part or having another gene such as a marker gene or a neomycin-resistant gene in the chromosome of its somatic cells or productive cells. This non-human animal is preferably a rodent, for example, mouse or the like.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-33087

(43)公開日 平成10年(1998)2月10日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 K 67/027			A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平8-193655

(22)出願日 平成8年(1996)7月23日

(71)出願人 596107888

田中 光一

東京都小平市小川東町4-1-1 I-402

(71)出願人 596107899

和田 圭司

東京都小平市小川東町4-1-1 I-301

(72)発明者 田中 光一

東京都小平市小川東町4-1-1 I-402

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グルタミン酸トランスポーター遺伝子機能欠損非ヒト動物

(57)【要約】

【課題】 グルタミン酸が関与する神経変性疾患や神経細胞死などの病態生理、病因の解明及び治療方法の開発等の研究のための実験用動物の提供。

【解決手段】 動物のグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能を欠損させる。特に、グルタミン酸トランスポーター遺伝子であるG l u T-1 遺伝子及び／又はG L T 1 遺伝子の機能を体細胞及び生殖細胞の染色体において欠損させ、ノックアウト動物を作成する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能の欠損が体細胞及び生殖細胞の染色体に存在する非ヒト動物。

【請求項2】 前記グルタミン酸トランスポーター遺伝子がGluT-1遺伝子及びGLT1遺伝子からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項1に記載の動物。

【請求項3】 グルタミン酸トランスポーター遺伝子のいずれかの部位が欠失しているか、又はいずれかの部位に他の遺伝子が挿入されることによりグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損している請求項1または2に記載の動物。

【請求項4】 前記他の遺伝子がマーカー遺伝子である請求項3に記載の動物。

【請求項5】 前記他の遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である請求項3または4に記載の動物。

【請求項6】 GluT-1遺伝子の第6エキソンにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されている請求項1～5のいずれか1項に記載の動物。

【請求項7】 GLT1遺伝子の第4エキソンにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されている請求項1～5のいずれか1項に記載の動物。

【請求項8】 前記動物が齧歯動物である、請求項1～7のいずれか1項に記載の動物。

【請求項9】 前記齧歯動物がマウスである、請求項8に記載の動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損したいわゆるノックアウト動物に関する。かかるグルタミン酸トランスポーター欠損動物は、神経変性疾患や神経細胞死などの病態生理、病因の解明及び治療方法の開発等の研究のための実験用動物として極めて有用である。

【0002】

【従来の技術】グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であると同時に、中枢神経系においてニューロンの可塑性や神経毒性に重要な役割を演じている。一般的に神経伝達物質にとって重要な性質は、それがシナプスから放出された後、その作用が急速に消失することである。グルタミン酸トランスポーターは、中枢神経系において、グリア細胞及び神経細胞の細胞膜に存在し、シナプス前部から放出されたグルタミン酸を取り込んで細胞外から取り除き、細胞外濃度を毒性濃度以下に低下させるメカニズムに関与する膜蛋白質であり、その存在する細胞によりグリア細胞型（GluT-1とGLT1）と神経細胞型（EAAC1とEAAT4）とに分類される。これらのグルタミン酸トランスポーターの異常により引き起こされる過剰な濃度のグルタミン酸が、神経変性疾

患や脳虚血に伴う神経細胞死等の原因となっていると考えられており、例えば、グルタミン酸トランスポーターの活性の低下が、アルツハイマー症や筋萎縮性側索硬化症（ALS）に関与しているという報告がなされている。また、これらのグルタミン酸トランスポーターのうち、マウスのGluT-1、GLT1及びEAAC1をそれぞれコードするcDNAがマウス脳から単離され、クローニングされている（Tanaka, Neuroscience Letters, 159, 183-186(1993)及びMukainaka et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1244, 233-237(1995)）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】したがって、グルタミン酸トランスポーターの欠損した遺伝的に安定な変異動物が系統的に得られれば、該蛋白質の生理的機能の研究だけでなく、上記神経変性疾患や神経細胞死等の病態生理、病因の解明及び治療方法の開発等の研究のための実験動物として極めて有用であると期待される。しかしながら、現在のところグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損した遺伝的に安定な動物は知られていない。上記の実情に基づき、本発明者らはグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損した遺伝的背景の明確な動物モデルを提供すべく鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0004】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明はグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物を提供する。特に、本発明はグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能欠損が体細胞及び生殖細胞の染色体に存在する上記非ヒト動物を提供する。さらに、本発明はグルタミン酸トランスポーター遺伝子であるGluT-1遺伝子及び／又はGLT1遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物、特にマウスを提供する。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明において、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能の欠損とは、該遺伝子が従来の構造とは異なっているために発現されず、グルタミン酸トランスポーターが産生されないことをいう。グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能を人為的に欠損させた動物を得るためには、グルタミン酸トランスポーター遺伝子をクローニングし、それをインビトロで何らかの方法によりその遺伝子の機能を欠損させた後に、該欠損遺伝子を動物に戻して、その動物自体又はその子孫の該遺伝子の機能を欠損させるという方法が用いられる。グルタミン酸トランスポーター遺伝子のクローニングは、例えばマウスの肝からゲノムDNAを抽出し、常法に従ってDNAライブラリーを作製し、次にこれを、すでにクローニングされているグルタミン酸トランスポーター遺伝子をコードするDNA、例えばcDNA（GluT-1については、上述のTanaka, Neuroscience Letters, 159, 183-186(1993)、GLT1については、上

述の Mukainaka et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1244, 233-237(1995) 参照) の部分配列をプローブとして用いてスクリーニングすることにより取得することができる。

【0006】本発明でいう非ヒト動物とはヒトを除く全ての動物をいい、好ましくは哺乳動物、より好ましくは齧歯動物、さらに好ましくはマウスである。動物に遺伝子を導入してその動物の個体又は子孫にその遺伝子を発現させる手法としては、(1) 遺伝子DNAを受精卵の前核期胚に注入する、(2) 組換えレトロウイルスを初期胚に感染させる、(3) 相同組換えを起こさせた胚性幹細胞 (ES細胞) を胚盤胞又は8細胞期胚に注入する、等の方法によって得られた宿主胚を動物に移植して産仔を得、これを他の個体と交配し、F1ヘテロ変異動物、さらにはF2ホモ変異動物を作成するという、従来からトランスジェニック動物の作成に常用されている公知の手法を挙げることができる。上記の手法のうち、ES細胞を用いる遺伝子導入の方法は、ES細胞に遺伝子を導入する工程とキメラ動物を作出する工程とを分けて行えるという利点を有しているので好ましい。ES細胞の培養は原理的には哺乳動物一般で可能であると考えられ、マウスの他に、ラット、ウサギ又はブタ、ウシ等の家畜についてもES細胞を確立すべく研究が進展していると考えられる。なお、ES細胞が培養されていないか、又は培養されていても生殖細胞にまで分化する細胞系が確立していない動物種については、上記(1)又は(2)等の方法を用いることができる。特に、ES細胞を用いる遺伝子導入の方法はマウスについて確立されているので、以下マウスを例にして本発明を説明するが、本発明は何らこの例によって限定されるものではない。

【0007】グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能を欠損させるためには、グルタミン酸トランスポーターをコードする遺伝子のいずれかの部分に欠失を生じさせるか、若しくは点変異を導入してもよく、又は他の遺

伝子を挿入してもよい。挿入する他の遺伝子としては、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の欠損を選別するためのマーカー遺伝子として機能する遺伝子を用いることが好ましい。そのような遺伝子としては、ポジティブ選別に用いるマーカー遺伝子、例えばネオマイシン (neo) 耐性遺伝子が好ましい。このネオマイシン耐性遺伝子は、ネオマイシン類似体であるG418を用いることにより目的遺伝子の選別を可能にする。また、目的遺伝子を選別除去するためにネガティブ選別に用いるマーカー遺伝子を上記ポジティブ選別用マーカー遺伝子とともに用いることもできる。このような遺伝子としては、チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子 (選別剤としてガンシクロビル、FIAU等を用い、それに対する感受性により非相同組換え体を選別除去する。) 及びジフテリアトキシンAフラグメント (DT-A) 遺伝子 (DT-Aにより発現されたジフテリア毒素により、非相同組換え体を選別除去する。) 又はこれらの組み合わせ等が用いられる。遺伝子の機能欠損とともにポジティブ選別の目的で用いられるマーカー遺伝子の挿入場所は特に限定されないが、通常エクソンに欠損が生じるように挿入する。マウスのGluT-1遺伝子は10個のエクソンを含み、ゲノム遺伝子の組織図 (制限酵素地図) 及び各エクソン-イントロン連結点の詳細は知られている (Hagiwara, Tanaka et al., GENOMICS, 33, 508-515(1996))。マウスのGLT1遺伝子については、本発明者らが図2に示すようなゲノム遺伝子の組織図 (制限酵素地図) を作成し、該ゲノム遺伝子が11個のエクソンを含むことを見い出した。本発明者らは、マウスGLT1遺伝子の各エクソン-イントロン連結点を解析し、その詳細を表1に示す。

【0008】

【表1】

表1

マウスGLT1遺伝子のエクソン-イントロン組織図

エキソン			イントロン			エキソン		
番号	大きさ(bp)	配列	供与部位	番号	大きさ(bp)	受容部位	配列	番号
1		AACAGAGG rThrGluG	gtagagct	1	>16,000	ctgttcag	TGCCAACA yAlaAsnAs	2
2	140	CTGTGTTG hrValPheG	gtaagigcc	2	~1,900	cttcaacag	GTGTATCC lyValilleL	3
3	153	TAATCACAG eulleThrG	gtagagct	3	~1,600	taaaccag	GGTTGTCAG lyLeuSerG	4
4	251	TTCCAGCAG PheGlnGln	gtaaccca	4	~4,100	ctccatag	ATTGAGACA lleGlnThr	5
5	166	ACGTCCTAG snValLeuG	gtaggata	5	~4,100	tgccatag	GTCTGATCG lyLeulleG	6
6	127	GATCATGTG illeMetTr	gtaagictg	6	~6,800	gttttcag	GTACTCCC pTyrSerPr	7
7	234	TGCTTCCAG rAlaSerSe	gtagaggac	7	~5,100	cgcccttag	TGCTGGAAC rAlaGlyTh	8
8	195	CACTGTAAG lThrValSe	gtagaglac	8	~5,100	cttttcag	CCTTACAGC rLeuThrAl	9
9	135	CTGGCTGCT pTrpLeuLe	gtaagigcc	9	~10,300	caacttag	GGATAGAA uAspArgMe	10
10	229	GAGTGCAAG GluCysLys	gtaccttgc	10	~4,000	gttttcag	GTAACCTCT ValThrLeu	11

したがって、例えば、GluT-1 遺伝子についてはエキソン6（4番目の膜貫通領域をコードしている。）に、GLT1 遺伝子についてはエキソン4（3番目の膜貫通領域をコードしている。）にグルタミン酸トランスポーター遺伝子の欠損が生じるようにマーカー遺伝子を挿入して、各々の遺伝子についてターゲティングベクター（相同組換え用DNA）を構築するのが好ましい。これらの遺伝子の挿入はインビトロで常用のDNA組換え技術により行うことができる。

【0009】次に、こうして得られたターゲティングベクター（相同組換え用DNA）を、ES細胞に導入し、ES細胞中のグルタミン酸トランスポーター遺伝子との間で相同組換えを行う。相同組換え用DNAのES細胞への導入は、例えば常用のエレクトロポレーションにより行うことができる。この相同組換えにおいては、ES細胞中のグルタミン酸トランスポーター遺伝子のDNAと相同組換え用DNAの対応する領域との間で組換えが生じ、相同組換え用DNA中に挿入されていたマーカー遺伝子がES細胞のゲノムのグルタミン酸トランスポーター遺伝子に挿入される。この結果、ES細胞はグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能を欠損し、同時にマーカー遺伝子を含むことになる。このマーカー遺伝子の選別機能に基づいて、グルタミン酸トランスポーター遺伝子機能を欠損したES細胞を選別することができる。

【0010】次に、このES細胞をマウスの胚盤胞又は8細胞期胚等の宿主胚に注入し、得られた胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植してキメラマウスを得る。このキメラマウスを適当な系統のマウスと交配することによりF1ヘテロ型の産仔を得る。キメラマウスの生殖細胞が相同組換え体、すなわちグルタミン酸トランスポーター遺

伝子が破壊されているES細胞に由来していれば、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能が欠損したマウスを得ることができる。ここでF1ヘテロ型産仔どうしを交配してF2ホモ型産仔を得ることができる。本発明の動物は、キメラ型動物、F1ヘテロ型動物及びF2ホモ型動物を包含する。グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能欠損の効果の点からF2ホモ型動物が好ましい。以下、上記の方法を工程に分けて説明する。

【0011】1) マウスグルタミン酸トランスポーター遺伝子のターゲティングベクター（相同組換え用DNA）の作成

マウスの肝から抽出したゲノムDNAを、制限酵素で部分消化してゲノムライブラリーを作成する。このゲノムライブラリーについて、グルタミン酸トランスポーターcDNAの部分配列をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを得る。これを適当なベクターに挿入した後、制限酵素で消化して、GluT-1については第6エキソンから第8エキソンを含む全長約9kbのゲノムDNAを、GLT1については第2エキソンから第4エキソンを含む全長11.2kbのゲノムDNAをサブクローニングする。次いで、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の構造を破壊するとともに、目的とする相同組換え体を選別するために、ポジティブ/ネガティブ選別を行う。かかる選別のために、例えば、GluT-1については、Yagiらの報告（Yagi, Nada, Watanabe et al., Analytical Biochemistry 214, 77-86 (1993))に従って、ネオマイシン耐性遺伝子及びジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子を挿入し、GLT1については、Mansourらの報告（Mansour, Thomas, Capacchi, Nature 336, 348-352 (1988))に従って、ネオマイシン耐性遺伝子及びチミジン

キナーゼ遺伝子を挿入する。

【0012】2) 相同組換えによるES細胞のグルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損

相同組換え用DNAを、マウスES細胞(例えば、E14株)(Hooper, Hardy, Handside et al., Nature 326, 292-295 (1987))を含むエレクトロポレーション用緩衝液に懸濁させ、ES細胞への遺伝子導入を行う。次いで、GluT-1についてはG418を、GLT1についてはG418及びガンシクロビルを選択剤として用いて選択培養を行う。選択剤に耐性のコロニーについて、相同組換え体の確認をサザンブロットによって行う。

【0013】3) 相同組換えES細胞によるキメラマウスの作成

グルタミン酸トランスポーター遺伝子機能が欠損している相同組換えES細胞を適切な系列のマウス、例えばC57BL/6J系マウスの胚盤胞又は8細胞期胚等の宿主胚に注入した後、得られた宿主胚に偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得る。宿主胚をどのような系統のマウスから得るかの選択は、常法に従い毛色等の表現型によりES細胞由来の細胞と宿主胚由来の細胞とを区別することができるように行う。

【0014】4) 相同組換えES細胞の生殖系列への伝達の検定

移植によって得られたキメラマウスを、例えばC57BL/6J系、129/J系又はICR系マウスと交配し、グルタミン酸トランスポーター遺伝子機能が欠損したES細胞由来の産仔が得られるか否かを検定する。たとえば、E14株のES細胞とC57BL/6J系の宿主胚を用いて得られたキメラマウスをC57BL/6J系と交配する場合は、娩出される産仔は、キメラマウスの生殖細胞が、相同組換えES細胞に由来していれば該ES細胞が由来するマウスと同じ野生色を呈し、宿主胚に由来していれば該宿主胚が由来するマウスと同じ黒色を呈する。グルタミン酸トランスポーター遺伝子の欠損は、離乳に至った後に尾からDNAを抽出後、サザンブロットを行って、確認することができる。

【0015】以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。

【実施例】

例1 GluT-1遺伝子機能欠損マウスの作成

1) マウスGluT-1遺伝子DNAの相同組換え用DNAの作成

129SVマウスの肝から抽出したゲノムDNA(野生型マウスGluT-1遺伝子)を、制限酵素Sau3AIで部分消化して得たゲノムライブラリーラムダFIX I Iについて、マウスGluT-1遺伝子のcDNAの部分配列をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行い、 1×10^6 個のコロニーについて検索した結果、26個の陽性クローンを得た。これを制限酵素E c

oRV及びXhoIで不完全消化させて、第6エクソンから第8エクソンを含む、全長9kbpのゲノムDNAをサブクローニングした(図1)。次いで、GluT-1遺伝子を破壊するために、第6エクソンのBamHI以降1.5kbpを欠損させ、そこにネオマイシン耐性遺伝子を、さらに第8エクソンの下流にジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子を挿入した。ゲノムDNAとの相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が2.5kb、ネオマイシン耐性遺伝子とジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子との間が5kbとなるように構築した。得られた構築体を、pBluescript SKに挿入し、ES細胞への導入の際に制限酵素NotIで切断して線状化することによりターゲティングベクター2(相同組換え用DNA: pGluT1NeoDT)を得た(図1)。

【0016】2) 相同組換え用DNAの導入によるES細胞のGluT-1遺伝子の欠損

相同組換え用DNA $75 \mu\text{g}$ をマウスES細胞(E14株) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1.8mM KH_2P O_4)に懸濁させ、Field Strength 210V/cm, Capacitance 500 μF の条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418(Genetis in, GIBCO BRL)濃度で選択培養を行った。

【0017】G418耐性コロニーを、遺伝子導入後192時間後から、マイクロピペットを用いて60 μl のTris-EDTA溶液(10mM Tris-HCl pH8.0と1mM EDTA pH8.0とからなる溶液)を含む96穴のマイクロプレート(FALCON 3077)に移し換え、数分間処理した後、ピペッティングすることによって単一細胞にし、これらを24穴のマイクロプレート(FALCON 3047)に移し換え、培養を継続した。採取したコロニーは、その長径がマイクロチップの内径の1/2以上に達したもので、この時の細胞数は、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個であった。エレクトロポレーション後の生存細胞数は、 6.0×10^7 個であった。G418耐性コロニー数は、 2.4×10^2 個で、生存細胞数の1/2. 5×10^5 であった。

【0018】24穴のマイクロプレート上の細胞が3～4日の培養でコンフルエントに達した段階で、細胞を0.25%トリプシンで、37℃で5分間処理後、順次、35mm(FALCON 3001)又は60mm(FALCON 3002)の組織培養用シャーレ内で培養し、細胞の増殖を図った。なお、ES細胞の培養は、すべてフィーダー細胞上で行った。相同組換え体の確認をサザンブロットによって以下の通りに行った。

【0019】サザンブロット解析については、G418耐性細胞からゲノムDNAを抽出し、制限酵素PvuI

1で消化後、第5イントロンのApaI-EcoRV断片、0.5 kbをプローブとして用いて行った。破壊された対立遺伝子を含む相同組換え体3 (図1) 及び非相同組換え体の確認は、それぞれ、4.2 kb及び7 kbのバンドの検出によって行った。相同組換え体コロニー数は、G418耐性コロニー242個中1個(2B7)であった。

【0020】3) ES細胞及びその培養方法

ES細胞として、129/SvJ系マウス胚盤胞由来のE14株を用いた。ES細胞の培養には、ダルベッコウ修正イーグル培養液(DMEM, 11960-010 GIBCO)に15%牛胎児血清(FCS)、0.1 mMの2-メルカプトエタノール、核酸混合液、非必須アミノ酸溶液及び 10^3 unit/mlのLIF (AMRAD)を添加したSCM培養液(Roberson, Teratocarcinomas and embryonic stem cells a practical approach 1987)を用いた。

【0021】また、ES細胞のフィーダー細胞として用いるマウス胎児繊維芽細胞の培養には、DMEMに10%FCSを添加したものを用いた。マウス胎児繊維芽細胞の調製及び培養は、以下の通りに行った。胎齢13~14日のICR系マウスの胎児を無菌的に採取し、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水(PBS-)で洗浄後、ピンセットを用いて心臓、肝臓及び腸管を除き、眼科用のハサミを用いて細切した。次いで、得られた細切片を0.25%トリプシン及び0.04%EDTAを含むPBS- (以下TE溶液という)で、室温で20分間処理して細胞浮遊液を得た。

【0022】細胞浮遊液を1500 rpm、5分間の遠心後、上清を除去し、10%FCS加DMEMに懸濁させて2分間静置した。そして、下部に沈んだ組織片を除いた細胞浮遊液を100 x 20 mmの組織培養用シャーレ(FALCON 3003)に移し、37℃, 5%CO₂, 95%空気の条件で培養に供した。翌日、細胞浮遊液をPBS-で1回洗浄し、培養を継続した。継代は、3~4日間隔で行い、継代が三代目までの細胞をフィーダーとして使用するためにマイトマイシン処理を施した。

【0023】コンフルエント状態にまで増殖したマウス胎児繊維芽細胞を2 mg/mlのマイトマイシンC75 µlで3~4時間処理し、PBS-で3回洗浄後、TE溶液で室温で3分間処理して細胞を剥離した。次いで、遠心後、細胞数を 5×10^5 /mlに調整し、60 x 10 mmのゼラチンコートディッシュ(FALCON 3002)に3 mlずつ分注した。以上のように作成したフィーダー細胞は、1週間以内に使用した。ES細胞の継代は、室温で5分間TE溶液で処理後、ピペッティングによってES細胞を単一細胞に分散させ、 4×10^5 個の細胞をフィーダー細胞層上に播種することによって行った。

【0024】培養液は、24時間間隔で交換し、継代間隔は、56~64時間とした。また、凍結保存する際には、 1×10^6 個の細胞をSCMに懸濁して凍結用チューブ(2 ml, FALCON 4818)に移し、0.5 mlの凍結用培地(20%DMSO加DMEM)を滴下した後、-80℃で一晩放置し、液体窒素中で保存した。

【0025】4) GluT-1遺伝子欠損ES細胞によるキメラマウスの作成

a) GluT-1遺伝子欠損ES細胞の胚盤胞への注入 ES細胞を、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に注入した後、得られた宿主胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、自然交配4日目に、Hepes-buffered-Whitten's培地で、子宮を灌流することによって行った。注入に用いたES細胞は、継代2日目又は3日目にTE溶液で処理を行った後、ゼラチンコートディッシュに30分間静置することによって、フィーダー細胞を除去し、顕微操作に供するまで、氷上に静置した。

【0026】ES細胞の注入用ピペットは、外径1 mmの微小ガラス管(NARISHIGE)を微小電極作製器(NARISHIGE, PN-3)を用いて細かく引き延ばし、研磨器(NARISHIGE)で、内径が約20 µmとなるように先端を研磨し、さらにマイクロフォージ(De Fonburun)で先端を鋭利に加工した。胚保定用ピペットは、上述の方法で引き延ばしたガラス管をマイクロフォージを用いて、外径50~100 µmの部分で切断した後、さらに口径を10~20 µmに加工して用いた。

【0027】注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約5 mmの部分約30度曲げて、マイクロマニピュレーター(LEITZ)に接続した。顕微操作に用いたチャンバーは、穴あきスライドガラスにカバーガラスを密着で接着させたものを用い、その上に約20 µlの5%FCS加Hepes-buffered-Whitten's培地のドロップを2個置き、その上面をミネラルオイル(M8410, Sigma)で覆った。一方のドロップには、約100個のES細胞を入れ、他方には、拡張胚盤胞を10~15個入れ、胚1個あたり10~15個のES細胞を注入した。

【0028】顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2時間の培養後、偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に哺育させた。自然交配4日目に、子宮を灌流することによって採取したC57BL/6J系マウスの胚盤胞160個にES細胞2B7を注入した結果、123個が生存し、成功率は77%であった。123個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、103個に着床が認められ、95匹の産仔が得られ

た。離乳に至った83匹の産仔のうち、毛色でキメラマウスと判定できたのは30匹で、このうち26匹が、形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおけるES細胞の寄与率は、10~95%の幅であり、寄与率が60%未満が10例、60%以上90%未満が14例、90%以上が2例であった。

【0029】b) キメラマウスの交配

移植によって得られたキメラマウスを、C57BL/6J系マウスと交配し、娩出される産仔(F1ヘテロ型マウス)がGluT-1遺伝子欠損ES細胞由来であるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していれば黒色を呈する。ES細胞の寄与率の高い(70%以上)9例(No. 1, 5, 13, 20, 33, 41, 54, 62, 81)のキメラマウスのうち、現在までに8例(No. 1, 5, 20, 33, 41, 54, 62, 81)について、ES細胞の生殖系列への伝達が確認された。

【0030】No. 5とC57BL/6J系雌マウスとの交配では、3回の分娩で合計23匹の産仔が得られ、このうち、23匹が野生色の毛色を示していた。また、No. 33とC57BL/6J系雌マウスとの交配で得られた15匹の産仔のうち、12匹が野生色の毛色を示した。これらの野生色マウスのうち23例についてサザンブロットによる解析を行った結果、11例でGluT-1遺伝子の欠損を確認した。次に、遺伝子の欠損が確認されたF1ヘテロ型マウスどうしを交配し、101匹の産仔が得られた。これらマウス全例をサザンブロットによる解析を行った結果、28例でGluT-1遺伝子欠損についてF2ホモ型のマウスを得た。

【0031】例2 GLT1遺伝子機能欠損マウスの作成

1) マウスGLT1遺伝子DNAの相同組換え用DNAの作成

129SVマウスの肝から抽出したゲノムDNA(野生型マウスGLT1遺伝子)を、制限酵素Sau3AIで部分消化して得たゲノムライブラリーラムダFIXIIに、マウスGLT1遺伝子cDNAの部分配列をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行い、 1×10^6 個のコロニーについて検索した結果、33個の陽性クローンを得た。これを制限酵素ApaI及びNotIで不完全消化させて、第2エキソンから第4エキソンを含む、全長11.2kbのゲノムDNA4をサブクローニングした(図3)。次いで、GLT1遺伝子を破壊するために、第4エキソンのNotI以降0.9kbpを欠失させ、そこにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、さらに第2エキソンの上流にチミジンキナーゼ遺伝子を挿入した。ゲノムDNAとの相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子の下流が4.2kb、ネオマイシン耐性遺伝子

とチミジンキナーゼ遺伝子との間が6.1kbとなるように構築した。得られた構築体を、pBluescriptSKに挿入し、ES細胞への導入の際に制限酵素KpnIで切断して線状化することによりターゲッティングベクター5(相同組換え用DNA: pGLT1NeoTK)を得た(図3)。

【0032】2) 相同組換え用DNAの導入によるES細胞のGLT1遺伝子欠損

相同組換え用DNA75μgをマウスES細胞(E14株) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液(137mM NaCl, 27mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄)に懸濁させ、Field Strength 210V/cm, Capacitance 500 μFの条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から250μg/mlのG418(Geneticin, GIBCO BRL)で選択培養を行ない、その48時間後からは、0.5μg/mlガンシクロビルも添加して、選択培養を継続した。

【0033】G418及びガンシクロビル耐性コロニーを、遺伝子導入後192時間後から、マイクロピペットを用いて60μlのTris-EDTA溶液を含む96穴のマイクロピペット(FALCON 3077)に移し換え、数分間処理した後、ピペッティングすることによって単一細胞にし、これらを24穴のマイクロプレート(FALCON 3047)に移し換え、培養を継続した。採取したコロニーは、その長径がマイクロチップの内径の1/2以上に達したもので、この時の細胞数は、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個であった。エレクトロポレーション後の生存細胞数は、 4×10^7 個であった。G418及びガンシクロビル耐性コロニー数は、 1.4×10^2 個で、生存細胞数の1/2、 9×10^5 であった。

【0034】24穴のマイクロプレート上の細胞が3~4日の培養でコンフルエントに達した段階で、細胞を0.25%トリプシンで、37℃で5分間で処理後、順次、35mm(FALCON 3001)又は60mm(FALCON 3002)の組織培養用シャーレ内で培養し、細胞の増殖を図った。なお、ES細胞の培養は、すべてフィーダー細胞上で行った。相同組換え体の確認をサザンブロットによって以下の通りに行った。

【0035】サザンブロット解析については、G418及びガンシクロビル耐性細胞からゲノムDNAを抽出し、制限酵素EcoRVで消化後、第4イントロンのApaI-EcoRV、0.8kbをプローブとして用いて行った。破壊された対立遺伝子を含む相同組換え体6(図3)及び非相同組換え体の確認は、それぞれ、9.5kb及び5.4kbのバンドの検出によって行った。相同組換え体コロニー数は、G418及びガンシクロビル耐性コロニー144個中4個(1B9、1C4、1F8、2A5)であった。

【0036】3) ES細胞及びその培養方法

ES細胞として、129/SvJ系マウス胚盤胞由来の

E14株を用いた。ES細胞の培養には、ダルベッコウ修正イーグル培養液 (DMEM, 11960-010 GIBCO) に15%牛胎児血清 (FCS)、0.1mMの2-メルカプトエタノール、核酸混合液、非必須アミノ酸溶液及び 10^3 unit/mlのLIF (AMRAD) を添加したSCM培養液 (Roberson, Teratocarcinomas and embryonic stem cells a practical approach 1987) を用いた。

【0037】また、ES細胞のフィーダー細胞として用いるマウス胎児繊維芽細胞の培養には、DMEMに10%FCSを添加したものを用いた。マウス胎児繊維芽細胞の調製及び培養は、以下の通りに行った。胎齢13~14日のICR系マウスの胎児を無菌的に採取し、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-) で洗浄後、ピンセットを用いて心臓、肝臓及び腸管を除き、眼科用のハサミを用いて細切した。次いで、得られた細切片をTE溶液で室温下20分間処理して細胞浮遊液を得た。

【0038】細胞浮遊液を1500rpm、5分間の遠心後、上清を除去し、10%FCS加DMEMに懸濁させて2分間静置した。そして、下部に沈んだ組織片を除いた細胞浮遊液を100x20mmの組織培養用シャーレ (Corning, 25020) に移し、37℃、5%、CO₂ 95%空気の条件で培養に供した。翌日、細胞浮遊液をPBS- で1回洗浄し、培養を継続した。継代は、3~4日間隔で行い、継代が三代目までの細胞をフィーダーとして使用するためにマイトマイシン処理を施した。

【0039】コンフルエント状態にまで増殖したマウス胎児繊維芽細胞を2mg/mlのマイトマイシンC75μlで3~4時間処理し、PBS- で3回洗浄後、TE溶液で室温で3分間処理して細胞を剥離した。次いで、遠心後、細胞数を 5×10^5 /mlに調整し、60x10mmのゼラチンコートディッシュ (FALCON 3002) に3mlずつ分注した。以上のように作成したフィーダー細胞は、1週間以内に使用した。ES細胞の継代は、室温で5分間TE溶液で処理後、ピペッティングによってES細胞を単一細胞に分散させ、 4×10^5 個の細胞をフィーダー細胞層上に播種することによって行った。

【0040】培養液は、24時間間隔で交換し、継代間隔は、56~64時間とした。また、凍結保存する際には、 1×10^6 個の細胞をSCMに懸濁して凍結用チューブ (2ml, FALCON 4818) に移し、0.5mlの凍結用培地 (20%DMSO加DMEM) を滴下した後、-80℃で一晩放置し、液体窒素中で保存した。

【0041】4) GLT1遺伝子欠損ES細胞によるキメラマウスの作成

a) GLT1遺伝子欠損ES細胞の胚盤胞への注入

ES細胞をC57BL/6J系マウスの胚盤胞に注入した後、得られた宿主胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、自然交配4日目に、Hepes-buffered-Whitten's培地で、子宮を灌流することによって行った。注入に用いたES細胞は、継代2日目又は3日目にTE溶液で処理を行った後、上述の方法でフィーダー細胞を除去し、顕微操作に供するまで、氷上に静置した。ピペットの作成及び顕微操作は、例1と同様に行った。操作胚は、1~2時間の培養後、偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に哺育させた。自然交配4日目に、子宮を灌流することによって採取したC57BL/6J系マウスの胚盤胞145個にES細胞1F8を注入した結果、107個が生存し、成功率は74%であった。107個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、88個に着床が認められ、78匹の産仔が得られた。離乳に至った65匹の産仔のうち、毛色でキメラマウスと判定できたのは32匹で、このうち28匹が、形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおけるES細胞の寄与率は、10~95%の幅であり、寄与率が60%未満が10例、60%以上90%未満が15例、90%以上が3例であった。

【0042】b) キメラマウスの交配

移植によって得られたキメラマウスを、C57BL/6J系マウスと交配し、娩出される産仔 (F1ヘテロ型マウス) がGLT1遺伝子欠損ES細胞由来であるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していれば黒色を呈する。ES細胞の寄与率の高い (70%以上) 10例 (No. 2, 5, 12, 21, 35, 40, 55, 63, 70, 75) のキメラマウスのうち、現在までに9例 (No. 2, 5, 12, 35, 40, 55, 63, 70, 75) について、ES細胞の生殖系列への伝達を確認された。

【0043】No. 12とC57BL/6J系雌マウスとの交配では、3回の分娩で合計21匹の産仔が得られ、このうち、21匹が野生色の毛色を示していた。また、No. 63とC57BL/6J系雌マウスとの交配で得られた18匹の産仔のうち、16匹が野生色の毛色を示した。これらの野生色マウスのうち21例についてサザンブロットによる解析を行った結果、9例でGLT1遺伝子の欠損を確認した。次に、遺伝子の欠損が確認されたF1ヘテロ型マウスどうしを交配し、98匹の産仔が得られた。これらマウス全例をサザンブロットによる解析を行った結果、20例でGLT1遺伝子欠損についてF2ホモ型のマウスを得た。

【0044】

【発明の効果】以上の通り、本発明は、遺伝子工学的方法でグルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能を欠損させた動物を提供する。この動物は、神経変性疾患や神経細胞死などの病態生理、原因の解明及び治療方法の開発等の研究のための実験用動物として極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

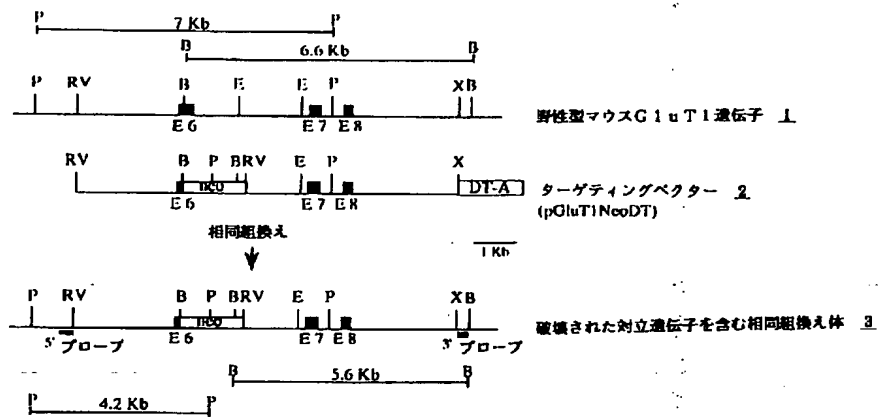
【図1】マウスGluT-1遺伝子のターゲティング破壊を示す模式図。各記号が示す制限部位に関する制限酵素は以下の通りである。P: PvuII、RV: EcoRV、B: BamHI、E: EcoRI、X: XhoI

1。

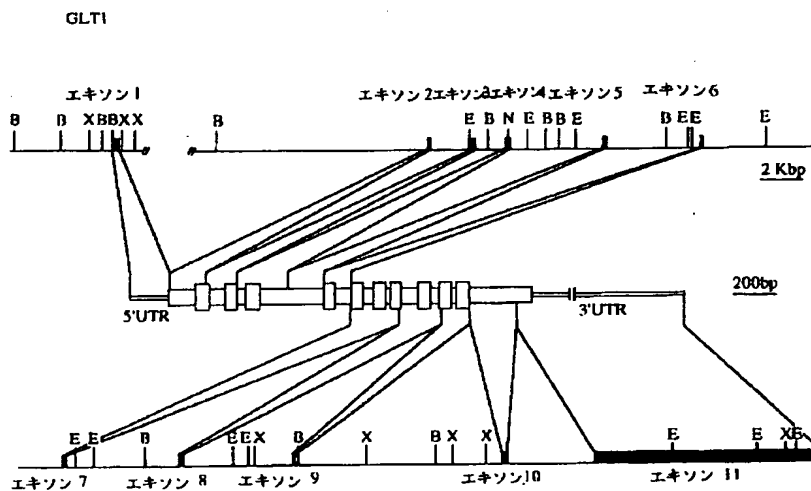
【図2】マウスGLT1遺伝子のゲノム遺伝子の組織図（制限地図）。各記号が示す制限部位に関する制限酵素は以下の通りである。E: EcoRI、B: BamHI、X: XhoI、N: NotI。

【図3】マウスGLT1遺伝子のターゲティング破壊を示す模式図。各記号が示す制限部位に関する制限酵素は以下の通りである。K: KpnI、A: ApaI、P: PvuII、RV: EcoRV、B: BamHI、E: EcoRI、X: XhoI、N: NotI。

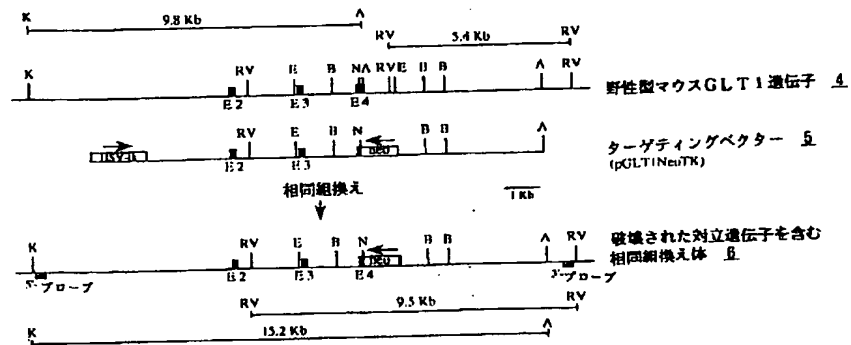
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 和田 圭司

東京都小平市小川東町4-1-1 I-

301